

University of Groningen

## Thermophilic P-loop transport ATPases

Pretz, Monika Gyöngyi

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2007

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Pretz, M. G. (2007). *Thermophilic P-loop transport ATPases: Enzyme function and energetics at high temperature*. s.n.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

## Nederlandse samenvatting

Thermofiele organismen groeien het beste bij relatief hoge temperaturen zoals bijvoorbeeld in natuurlijk voorkomende warmtebronnen als geysers en diepzeebronnen. Het eerste extreem thermofiele organisme werd in 1967 ontdekt in het Lower Geyser Basin in het Yellowstone National Park door professor Thomas Brock. Hij plaatste een schoon objectglaasje in het hete water van Mushroom Pool en bekeek dit na een paar dagen onder het microscoop. Het glaasje bleek bedekt te zijn met cellen. Deze cellen konden verder worden gekweekt in het laboratorium en het door Brock geïsoleerde organisme dat bij temperaturen van rond de 80°C kon groeien werd *Thermus aquaticus* (229) genoemd. Door de ontdekking van dit soort thermofiele organismen leerde men dat er leven voor kon komen bij veel hogere temperaturen dan men aanvankelijk had gedacht. Bovendien leidde deze ontdekking tot succesvol onderzoek naar enzymen van thermofiele organismen, zoals het “Taq” DNA polymerase van *T. aquaticus* dat door ze hoge hittestabiliteit inzetbaar is onder extreme reactie condities. Thans zijn er zeer veel verschillende soorten extreem thermofiele organismen ontdekt.

Thermofiele organismen worden verdeeld in obligate en facultatieve thermofielen. Obligate thermofielen worden ook wel extreme thermofielen genoemd en hebben een hoge temperatuur nodig om te kunnen groeien. Facultatieve thermofielen kunnen zowel bij hoge als bij lagere temperaturen groeien. Organismen die optimaal groeien bij een temperatuur boven de 80 °C worden hyperthermofiel genoemd. De meeste extreem- en hyperthermofiele organismen die geïsoleerd zijn, behoren tot het domein van de Archaea. In 1977 werden de Archaea (enkelvoud archaeon) door Carl Woese met behulp van DNA-onderzoek geïdentificeerd als een apart domein dat zich onderscheidt van andere prokaryoten op basis van de 16S rRNA phylogenetische boom. Woese hernoemde de drie levensdomeinen tot Archaea, Bacteriën en Eukaryoten (25). Het eerste archaeon dat beschreven werd, is *Sulfolobus acidocaldarius* (176). Op basis van het 16S rRNA wordt het domein van de Archaea verdeeld in twee subdomeinen namelijk de euryarchaeota en crenarchaeota. Tot de euryarchaeota behoren onder andere de methanogenen, die onder anaerobe omstandigheden methaan produceren en de halofielen, die in milieus met een extreem hoge zoutconcentratie groeien. Tevens behoort tot deze groep een aantal extreem thermofiele aerobe en anaerobe organismen en extreem acidofiele thermofielen. De meeste crenarchaeota zijn thermofiele of hyperthermofiele organismen, waarvan sommigen kunnen groeien bij een temperatuur van wel 113 °C (230). Extreem- en hyperthermofielen zijn echter ook te vinden in twee subdomeinen van het Bacterie domein, namelijk bij de *Thermotogales* en *Aquificales* (24;25).

In dit proefschrift staan twee verschillende organismen centraal: *Sulfolobus solfataricus* en *Thermotoga maritima*. *Sulfolobus* soorten behoren tot de crenarchaeoten en deze worden wereldwijd gevonden en geïsoleerd uit solfatarische gebieden (waar bij afnemende vulkaanactiviteit een uitstroom van zwavelwaterstof voorkomt) en heetwater- en modderpoelen. *S. solfataricus* is een extreem thermoacidofiel organisme dat optimaal groeit bij een temperatuur tussen 70 en 90 °C en bij een pH waarde van 2 tot 4 (176). *Sulfolobus* cellen zijn aerobe, gelobde kokken omgeven door een S-laag (eiwitlaag). *T. maritima* is een van de meest extreme thermofiele bacteriën; deze kan groeien tot een temperatuur van 90 °C en groeit optimaal bij 80 °C (174). *T. maritima* behoort tot de *Thermotogales*, die een uniek subdomein vormen van hyperthermofiele micro-organismen. Ze staan op een relatief grote afstand van alle andere bacteriën in de phylogenetische stamboom en vormen de diepste en langzaamst evoluerende tak in het bacteriedomein dat tot nu toe is ontdekt. *Thermotogales* zijn hyperthermofiele, staafvormige, obligaat anaerobe organismen die een omhulsel hebben dat de toga genoemd wordt.

Om te kunnen overleven, hebben thermofielen enzymen nodig die kunnen functioneren bij hoge temperaturen. Enzymen van thermofielen worden ook wel extremozymen genoemd (231). Deze zijn in staat om hun driedimensionale structuur te behouden bij hoge temperaturen door zich strakker op te vouwen dan vergelijkbare mesofiele (niet-thermofiele) enzymen. Thermofiele enzymen zijn niet alleen thermostabiel (hittebestendig), maar ze zijn ook beter bestand tegen algemeen gebruikte eiwit denaturerende middelen dan hun mesofiele tegenhangers. Recente studies aan de structuren van een aantal hyperthermostabiele eiwitten laten zien dat verschillende mechanismen gebruikt worden ten behoeve van enzymthermostabilisatie (33). Deze eiwitten kunnen een verhoogd aantal waterstofbruggen en hydrofobe (waterafstotende) aminozuurresiduen bevatten, en een strak opgevouwen structuur hebben, waardoor de hittestabiliteit verhoogd wordt. Bij een ander mechanisme zijn er geen significante verschillen in vergelijking met mesofiele eiwitten wat betreft de dichtheid van de opgevouwen structuur. In plaats daarvan lijkt dan de thermostabiliteit samen te hangen met een vrij klein aantal sterke ionische interacties (34;35). Op grond van hun hoge stabiliteit zijn deze eiwitten zeer interessant voor de moleculaire en structuurbiologie, maar ook voor studies betreffende de mechanismen van eiwitvouwing en eiwit-kristallisatie. Ze blijven stabiel onder omstandigheden waarbij mesofiele eiwitten gedenameerd zouden worden. Om vergelijkbare redenen zijn de eiwitten ook interessant voor industriële toepassing zoals in de biotechnologie.

Dit proefschrift beschrijft de functie en de werking van transport ATPases van thermofiele organismen. Deze eiwitten zijn betrokken bij het transport van moleculen door het membraan en vormen feitelijk de motor achter deze processen door de algemeen inzetbare vorm van energie,

namelijk ATP te hydrolyseren. De binding, hydrolyse en het vrijgeven van de nucleotiden resulteert in geordende veranderingen in de structuur van deze ATPases wat vervolgens de opening en het sluiten van een transportkanaal veroorzaakt waardoor het substraat over het membraan getransporteerd kan worden. Transport ATPases worden vaak *P-loop* ATPases genoemd (1) op basis van zeer geconserveerde aminozuur sequenties in de fosfaat en nucleotide bindende domeinen. Naast sequentiehomologie werd met behulp van structuuranalyse van deze ATPases het prototype van een typische nucleotide bindend domein (NBD) aangetoond (2) genaamd de *RecA fold*.

In **Hoofdstuk II** wordt het onderzoek naar de SecA-, SecYE- en SecYEG-componenten van het eiwituitscheidingscomplex van *T. maritima* beschreven. SecA is een transport ATPase met de typische *RecA fold* en het functioneert als een motoreiwit dat zorgt voor de transport van eiwitten door een in het membraan gelegen porie ook wel SecYEG genoemd. Het doel van dit onderzoek was om een functioneel Sec-translocase uit een thermofiele bron te verkrijgen voor eiwitkristallisatie. De Sec-componenten werden tot overexpressie gebracht in *E. coli* en daarna gezuiverd. De SecYE- en SecYEG-complexen werden opnieuw ingebouwd in lipide vesikels (met andere woorden gereconstitueerd in proteoliposomen) om hun functionaliteit te valideren. Het geïsoleerde SecA liet een basale ATPase activiteit zien met een maximum bij 74 °C, wat dicht bij de temperatuur ligt waarbij het organisme groeit. Deze basale activiteit werd verviervoudigd in de aanwezigheid van geïsoleerde *Thermotoga* lipiden. Een gezuiverd substraateiwit en proteoliposomen of *vesicles* met SecYE verdubbelde de ATPase-activiteit van SecA; de activiteit werd nog meer verhoogd in aanwezigheid van SecG, de derde component van de membraanporie. Aangenomen werd dat SecG vooral nodig zou zijn in *E. coli* voor eiwittranslocatie bij lage temperatuur. Dit onderzoek laat echter zien dat het SecG-eiwit de ATPase-activiteit van het *T. maritima* SecA ook stimuleert bij hoge temperatuur. Dit geeft aan dat het stimulerende effect van SecG niet alleen beperkt is tot een lage temperatuur. Visualisering van kleine tweedimensionale kristallen van het SecYE-complex met behulp van een electronenmicroscop liet vierkante deeltjes zien met dimensies van ongeveer 6 nm; dit zijn waarschijnlijk dimeren van het SecYE-complex. Voor de tweedimensionale kristallisatie werd gebruik gemaakt van een enkele lipide-laag (*monolaag*) die een lage concentratie van een Ni<sup>+</sup>-bindend lipide bevatte. Hierdoor kon het His-tagged SecYE-complex in een bepaalde oriëntatie gebonden worden aan de monolaag en werden er kleine kristallen op het lipide oppervlak gevormd. Doordat de His-tag aan de C-terminus van het SecY zat, was de SecA-bindingsplaats van het SecYE-complex waarschijnlijk naar de monolaag gekeerd en kon daarom niet bekeken worden. Om het SecA-SecYE-complex zichtbaar te kunnen maken, zou het interessant zijn om SecYE in een omgekeerde oriëntatie te krijgen, door

bijvoorbeeld de His-tag aan de C-terminus van SecE in het periplasma te plaatsen. Pogingen om dit complex te maken zijn helaas niet gelukt, omdat het moeilijk bleek voldoende grote hoeveelheden van dit complex gezuiverd in handen te krijgen.

Het tweede type transport ATPases dat in dit proefschrift centraal staat is dat van de ATP-bindende-cassettetransporters. Deze ABC-transporters vormen een grote groep eiwitten die voorkomen in alle domeinen van het leven. Deze eiwitten spelen een rol in een groot aantal cellulaire processen en ze transporteren een breed scala van moleculen, zoals suikers, aminozuren, hydrofiele drugs, vitamines, lipiden enzovoort over het membraan. Mutaties in genen die coderen voor ABC-transporters kunnen ziektes veroorzaken, bijvoorbeeld hypercholestermie, adrenoleukodystrofie, de ziekte van Stargardt of taaislijmziekte. Daarbij zijn een aantal ABC-transporters verantwoordelijk voor multidrugresistentie, wat een groot probleem is tijdens de behandeling van kanker met behulp van chemotherapie.

ABC-transporters bestaan uit een homo- of heterodimeer nucleotide-bindingsdomein (NBD), dat bindt aan het *membrane omspannende*-domein (MSD). De MSD's vormen het feitelijke transportkanaal en kan ook zowel homo- als heterodimeer zijn. Substraat transport wordt aangedreven door binding en hydrolyse van ATP door de NBD's, wat er waarschijnlijk voor zorgt dat de structuur van de MSDs verandert waardoor het transportkanaal geopend en gesloten wordt. In eukaryoten zijn de NBD en MSD domeinen vaak samengevoegd tot een enkel polypeptide, maar bij bacteriën en archaea worden ze vaak als aparte domeinen aangetroffen. De aminozuurvolgorde overeenkomst tussen de NBD's is groot en dit duidt erop dat deze transporters functioneren doormiddel van een geconserveerd werkingsmechanisme. De NBD's bevatten karakteristieke aminozuurmotieven, bijvoorbeeld de Walker A en Walker B en *C-loop* motieven, die in alle ATP-bindende eiwitten gevonden worden en waarvan de structuren geconserveerd worden in de typische RecA-achtige fold. Omdat de transporters voorkomen in elke levensvorm en een belangrijke rol spelen in ziektes bij de mens zijn ze een van de meestbestudeerde transportereiwitfamilies. Er zijn talrijke biochemische studies uitgevoerd en verschillende kristalstructuren van ABC-NBD's zijn opgehelderd; dit alles heeft onze kennis van deze transporters zeer vergroot.

In **Hoofdstuk III** werd het mechanisme bestudeerd waarmee ATP tot ADP gehydrolyseerd wordt door GlcV, het NBD van de glucose-ABC-transporter van *S. solfataricus*. In deze studie werd gebruik gemaakt van isothermale titratiecalorimetrie (ITC). Deze methode meet direct de warmte die bij de reactie vrijkomt (enthalpieverandering,  $\Delta H$ ), de stoichiometrie van de binding van het substraat ( $n$ ) en de bindingsaffiniteit van het substraat ( $K_a$ ). Met deze waarden kan de Gibbs energie van de binding reactie ( $\Delta G = -RT \ln K_a$ ) en de entropie ( $T\Delta S = \Delta H - \Delta G$ ) berekend worden. Omdat de enthalpie afhankelijk is van de temperatuur kunnen bovendien de veranderingen in de

warmtecapaciteit ( $\Delta C_p = \Delta \Delta H / \Delta T$ ) bepaald worden. Het gebruik van een thermostabiel eiwit zoals GlcV heeft de voorkeur in dit soort studies, want experimentele gegevens kunnen worden verkregen bij veel verschillende temperaturen. Hierdoor kunnen de thermodynamische parameters preciezer bepaald worden. Om de thermodynamica van de ATPase-cyclus van GlcV te analyseren, werden mutanten gebruikt die in verschillende stadia van de catalytische cyclus geblokkeerd zijn. De G144A- en E166A-mutanten die mutaties hebben in de C-loop en in het residu na het Walker B-bindingsmotief respectievelijk, vertonen een sterk gereduceerde ATPase-activiteit. De G144A-mutant is niet meer in staat om dimeren te vormen. De E166A-mutant kan daarentegen nog wel dimeriseren, maar kan dan niet meer dissociëren. De resultaten lieten zien dat deze mutaties geen effect hebben op de nucleotide-bindingsstoichiometrie en slechts een klein effect op de bindingsaffiniteit. Met behulp van deze drie eiwitten konden de thermodynamische parameters van de verschillende stappen van de ATP-hydrolytische cyclus bepaald worden. De verschillende opeenvolgende processen in de ATP-hydrolysecyclus blijken allemaal energetisch voordelig zijn, behalve mogelijk de laatste stap in de cyclus, het loslaten van de ADP uit het NBD dat een energetisch onvoordelig proces lijkt te zijn. Deze stap wordt echter aangedreven door de thermodynamisch veel voordeligere binding van ATP in de volgende catalyseronde.

Na de bepaling van de thermodynamica van de ATP-hydrolysecyclus werd de dichtheid van de vouwstructuur van het eiwit, de domeinorganisatie en het effect van nucleotiden op de stabiliteit van de structuur van GlcV bestudeerd. In **Hoofdstuk IV** werd differentiële scancalorimetrie (DSC) gebruikt om de hitte geïnduceerde ontvouwing van GlcV en van de GlcV mutanten in af- en aanwezigheid van nucleotiden te bepalen. Het ontvouwen van het wildtype enzym resulteerde in een enkele ontvouwingsovergang waarna het eiwit snel neersloeg. Door de neerslag konden de DSC-thermogrammen niet kwantitatief geanalyseerd worden. Zowel aminozuurvolgorde-vergelijking als de kristalstructuur van GlcV lieten echter twee domeinen zien: het typische RecA-achtige NBD-domein dat gekoppeld is aan het  $\beta$ -barrel-vormige C-terminale domein doormiddel van een *linker regio*. Een vergelijkbare C-terminale extra domain is ook beschreven voor andere ABC-ATPases (13;147;154;155), waar het zou functioneren als een regulerend domein. Omdat de nucleotide-afhankelijke stabilisatie van een enkele ontvouwingsovergang was waargenomen, werd voorgesteld dat deze ontvouwing te wijten is aan de NBD en dat het C-terminale domein een hogere smelttemperatuur ( $T_m$ ) heeft. De ontvouwing van dit stabielere domein zou in de DSC-experimenten verder onopgemerkt blijven door de neerslag van het eiwit. Het DSC-thermogram van de mutant met een mutatie in het ABC-*signature*motif (G144A) liet zien dat deze mutatie niet leidt tot een verandering in de ontvouwing. Daarentegen lieten de mutanten E166A en E166Q twee thermale ontvouwingsovergangen zien, wat erop duidt dat de ontvouwing van de twee domeinen

ontkoppeld werd wanneer het glutamaat residu was vervangen door alanine of glutamine. De DSC-resultaten suggereren dat het wildtype GlcV een eiwit is met tenminste twee domeinen, waarvan alleen het NBD-domein ontvouwt voordat het eiwit precipiteert. Mutagenese van E166 leidt tot een verstoring in de NBD-structuur wat resulteert in het ontvouwen van het NBD-domein in twee stappen.

Thermofiele ATPases maken gebruik van verschillende mechanismen om de stabiliteit van hun structuur te verhogen en om hun functionaliteit bij hoge temperatuur te behouden. GlcV vertoonde een hoge stabiliteit tegen het eiwitsplitsende enzym trypsine maar na toevoeging van ATP of de niet hydrolyseerbare ATP analoog AMP-PNP, wordt GlcV nog ongevoeliger voor afbraak. Het eiwit blijft resistent tegen het eiwit-afbrekende trypsine in aanwezigheid van ADP. Dit resultaat komt overeen met de structurele veranderingen die zijn waargenomen in ABC-ATPases (13;151;152). Na ATP-binding vindt er een grote structuurverandering plaats die leidt tot een beweging in het NBD. Na deze bewegingen leiden structuurveranderingen in het monomere NBD tot de vorming van een dimeer. Wanneer bovendien foto-geactiveerde covalente binding van een nucleotideanaloog werd gebruikt naast trypsine behandeling, kon de vorming van de dimere toestand van GlcV waargenomen worden. Samengevat duiden deze resultaten erop dat GlcV een stevige eiwitstructuur heeft wat resulteert in een zeer stabiel ATPase.

Onze thermodynamische analyse werd uitgevoerd met het complete GlcV-eiwit en kon daarom geen uitsluitsel geven over hoe het regulerende domein de eiwitstabiliteit en –functionaliteit beïnvloedt. Daarom werden er genetische vectoren geconstrueerd die het GlcV-eiwit zonder het C-terminale regulerende domein tot overexpressie konden laten brengen. Hoewel het eiwit hoog tot overexpressie kon worden gebracht, werden alleen maar eiwitaggregaten verkregen. Zonder het regulerende domein kan het heterologe geëxprimeerde GlcV zich blijkbaar niet vouwen tot zijn normale toestand; waarom is niet bekend. In dit opzicht zou het interessant zijn om een set verkorte GlcV-eiwitten van verschillende lengtes te testen, want een gebrek aan correcte eiwitvouwing in oplossing zou een onbeduidende waarneming kunnen zijn. Mogelijk is het een gevolg van een ongelukkige splitsingsplaats waar de N- en C-terminale regionen van GlcV van elkaar gescheiden werden. Toekomstige experimenten moeten daarom uitsluitsel geven of het C-terminale deel van GlcV bijdraagt aan de stabiliteit van het eiwit en mogelijk aan de stabiliteit van de GlcV dimeer die een belangrijke rol speelt in het transport van glucose over het membraan.

# Dankwoord

Everything started in Pozzuoli, Italy in summer of 1998, where we had spent a wonderful holiday in the close nearby of the Volcano Solfatara. To wake up in the morning with the smell of sulfuric gases arising from the mud ponds where *Sulfolobus solfataricus* grows clearly had a toxic effect on me so I have decided to search for a research group where I could find out more of such an extraordinary organism. With the encouragement of Miklos I had sent out several letters to European universities to find a project on *Sulfolobus* for my Master degree. Luckily Marieke Elferink had replied to my letter and encouraged to join the Extremophile Group at the Department of Molecular Microbiology. Dear Marieke with your kind invitation you opened an immense possibility for me. With the help of Marieke and Sonja Albers I entered the wonder of extremophile world and had spent 7 month working on signal sequencing of AraV and GlcV. Some poisons act in such a way that you want to stay poisoned therefore I was more then happy when Arnold Driessen offered me a PhD position in the Extremophile group.

Dear Arnold thank you for the opportunity to be a member of your group and to have a project where I could not only to be the member of the Extremophile- but also of the Protein Secretion group. With your supervision I have not only gained knowledge of different fields of science but also about strength and steadfastness of purpose. Working beside you revealed the deepness of scientific thinking and gave me supervision with the feeling of freedom.

Sonja, you were there with me from the very first day, in science, in life equally. Your ability to be a strict boss (without being bossy) and a friend at the same time helped me through the hardest times. Your scientific fantasy combined with hard work makes you a role model for me.

Members of the Extremophile group will always be in my heart; my dear friend and paranimf Zalan Szabo, Asia Lubelska, Sonja Koning, Oscar Aguilera, my student Vicky Garrido, and finally Titia Plantinga our honorary member. I will never forget our brainstorm along with cookies in the mornings. We formed a special group to help and to hold, to cheer up and to encourage each other. Thank you very much!

Chris van der Does, it is clear that your enthusiasm and power of conception gave a new turn to my project. It was great joy to work with you, to gain energy from your never ending enthusiasm and to try to grow up to your imagination.

I also would like to thank to my labmates; Jelto Swaving my supervisor in the first year, Janny de Wit from whom I learnt a lot about organization and discipline, Paolo Natale, Redmar Bol and Gea Schuurman-Wolters, who helped me toward the inside of calorimetry.

Francois du Plessis you are a wonderful person and I will never forget our conversations about life. I am happy that you as my paranimf will stand beside me on the promotion.



## Chapter 6

I would like to acknowledge people of the Protein Secretion group, and members of the Molecular Microbiology group, please excuse me for not listing you all.

I am grateful for Bea Zand-Scholten, Manon Dusseltje and Marga Brink for helping me in all the paperwork, without you I would have been lost in the Dutch bureaucracy.

Last but not least to my family. My parents who gave me their loving support through out my whole life, especially to my Mom who took the best care of my son David when I needed to work.

Miklos, without your encouragement I did not even dare to enter the World of Science. You gave me not only your loving heart but showed a good example with your extraordinary persistence. Sharing my life with you is the biggest treasure for me. David and Sara you are the most precious for me, there are no words to express the happiness you brought into my life.